



Dissertação | Artigo de revisão bibliográfica
Mestrado Integrado em Medicina

APLICAÇÕES ACTUAIS DE *DRIED BLOOD SPOT* E SEU POTENCIAL PARA O FUTURO

João Carlos Barros Rodrigues

Orientador:

Doutora Esmeralda Martins

Co-orientador:

Dr.^a Dulce Quelhas

Porto, 2017

João Carlos Barros Rodrigues

**APLICAÇÕES ACTUAIS DE
DRIED BLOOD SPOT E SEU
POTENCIAL PARA O FUTURO**

Dissertação de Mestrado Integrado em
Medicina submetida no Instituto de Ciências
Biomédicas Abel Salazar

Ano letivo 2016/2017

Orientador: Doutora Esmeralda Martins

Título profissional: Professora Auxiliar
Convidada do ICBAS, Assistente Hospitalar
Graduada de Pediatria

Co-orientador Dr.^a Dulce Quelhas

Título profissional: Assessora, Técnica
superior de Saúde - ramo Genética

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar da Universidade do Porto,
Rua de Jorge Viterbo Ferreira n.º 228,
4050-313 Porto

Agradecimento

À Doutora Esmeralda Martins, minha Orientadora e à Doutora Dulce Quelhas, minha co-orientadora, pela paciência, apoio, disponibilidade, profissionalismo e empenho que demonstraram ao longo do desenvolvimento da presente Dissertação de Mestrado, a minha gratidão.

Lista de siglas e abreviaturas

CMV - Citomegalovírus

DBS - *Dried blood spot*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EBV - Epstein Barr Vírus

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HAV - Vírus hepatite A

HBV - Vírus hepatite B

hCG - Gonadotrofina coriônica humana

HCV - Vírus hepatite C

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

HTLV-1 - Vírus linfotrópico da célula T humana tipo 1

HTLV-2 - Vírus linfotrópico da célula T humana tipo 2

IgA - Imunoglobulina A

IgE - Imunoglobulina E

IgM - Imunoglobulina M

LC - Cromatografia líquida

LC/MS - Cromatografia líquida e espectrometria de massa

LCHAD - acetil coenzima-A de cadeia longa

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MCAD - acetil coenzima-A de cadeia média

MLPA - Multiplex de sondas dependente de ligação

MS - Espectrometria de massa

MS/MS - Espectrometria de massa em *tandem*

PAPPA-A - Proteína A plasmática associada à gravidez

pCR - Proteína c reativa

PCR - *Polymerase chain reaction*

PKU – Fenilcetonúria

PSA – Antígeno específico da próstata
Q-PCR - *quantitative polymerase chain reaction*
RIA - Radioimunoensaio
RNA - Ácido ribonucleico
RNS - Rastreio neonatal sistemático
RT- PCR - *reverse trasncription polymerase chain reaction*
T3 - Triiodotironina
T4 - Tetraiodotironina
TREC - *T-Cell Receptor Excision Circles*
TSH - Hormona estimulante da tiróide

Índice

Agradecimentos	ii
Lista de siglas e abreviaturas	iii
Índice	v
Resumo	1
<i>Abstract</i>	2
1. Introdução	3
2. Análise com <i>Dried Blood Spot</i>	5
2.1. Procedimentos inerentes ao DBS como amostra biológica	5
2.1.1. Colheita	5
2.1.2. Conservação	6
2.1.3. Estabilidade	6
2.1.4. Envio	7
2.1.5. Extração	7
2.1.6. Efeitos das propriedades do sangue	7
2.2. Metodologia na análise de DBS	8
2.3. Marcadores biológicos quantificáveis pelo DBS	10
2.4. Vantagens e Desvantagens	11
2.4.1. Vantagens	11
2.4.2. Desvantagens	13
2.5. Aplicações do DBS	14
2.5.1. Aplicações na área do diagnóstico - Período neonatal	14
2.5.2. Aplicações na área do diagnóstico após o período neonatal	15
2.5.3. Aplicações na monitorização da doença	17
2.5.4. Outras aplicações	18
2.5.5. Futuro	18
3. Discussão	20
Referências Bibliográficas	21
Anexos	23

Resumo

A investigação e rastreios de base populacional têm tido como significativos fatores limitantes obstáculos logísticos associados à colheita e análise de amostras biológicas em ambientes comunitários. Contudo, desenvolvimentos metodológicos recentes permitiram ultrapassar muitas dessas restrições e expandir as opções dos biomarcadores a incorporar numa pesquisa populacional. Em particular, as amostras de sangue seco (*dried blood spot* ou DBS) - gotas de sangue capilar colhidas num papel de filtro - fornecem um método minimamente invasivo para a recolha de amostras, tanto em ambiente clínico como num ambiente não-clínico. Originalmente, essa abordagem foi desenvolvida nos anos 60, para o rastreio da fenilcetonúria em recém-nascidos e posteriormente aplicada a outros rastreios populacionais.

Após uma explicação sobre os procedimentos de colheita, manuseio e análise das amostras de DBS, assim como a metodologia subjacente, discutir-se-á o seu uso para a deteção de diversos marcadores biológicos quando acompanhada do desenvolvimento de várias tecnologias de análise e a sua aplicação prática presente e perspectivas futuras.

Palavras chave: *Dried blood spot*; espectrometria em massa em tandem; rastreio neonatal; marcadores biológicos;

Abstract

Population-based screening and research had, until recently, significant limiting logistical obstacles related with collection and analysis of biological samples in the community . However, recent methodological developments have made it feasible to overcome many of these constraints and expand the options for biomarkers to be incorporated into population-based research. In particular, dried blood spot (DBS) - whole blood drops collected on filter paper from a finger puncture - provides a minimally invasive method for collecting blood samples, in a clinical as well as in a non-clinical setting. Originally, this approach was developed in the 1960s for the screening of phenylketonuria (PKU) in newborns.

After a brief explanation of the procedures for collection, handling and analysis of the DBS samples, as well as the underlying methodology, their uses will be discussed regarding the detection of various biomarkers when accompanied by the development of other analytical technologies, such as mass spectrometry (MS).

Keywords: Dried blood spot; Tandem mass spectrometry; Neonatal screening; Biological markers;

1. Introdução

A ideia de colher sangue capilar em cartão de papel de filtro e posteriormente utilizar estas amostras de sangue seco (*dried blood spot* ou DBS) para fins de diagnóstico tem mais de um século, tendo sido descrita pela primeira vez por Ivar Bang.(1) Esta pequena quantidade de sangue, utilizada depois de seca à temperatura ambiente, permite várias determinações dispensando a punção venosa e a consequente centrifugação.

Este tipo de amostra foi inicialmente utilizada na determinação da glicemia e no diagnóstico da sífilis, mas a sua importância assumiu um papel mais relevante após 1963 quando Robert Guthrie adota esta técnica de colheita para desenvolver o rastreio da fenilcetonúria em recém-nascidos.(1) Para este rastreio, ele cria e altera as características do papel de colheita (papel de filtro de composição, textura, espessura e porosidade padronizadas), que passa a ser designado como *Guthrie card*.(2)

Após o sucesso do rastreio da fenilcetonúria, em que o diagnóstico e tratamento precoce permite evitar a instalação de uma doença neurológica grave e atraso cognitivo, outros rastreios foram iniciados no mesmo grupo etário, tendo sempre como finalidade o diagnóstico pré-sintomático de patologias para as quais existe terapêutica. Atualmente o rastreio neonatal da fenilcetonúria e outros erros inatos do metabolismo tratáveis, assim como o rastreio do hipotireoidismo congénito, é efetuado na quase totalidade dos países desenvolvidos. Os rastreios das hemoglobinopatias, imunodeficiências primárias e da fibrose quística estão também a ser realizados num número crescente de países.(3)

Mais recentemente, a descoberta de novas tecnologias como a espectrometria de massa em *tandem*, (MS/MS), a produção de anticorpos monoclonais e a *polymerase chain reaction* (PCR), veio permitir a aplicação potencial da DBS a áreas nomeadamente em rastreios de doenças genéticas, o diagnóstico da infeção pelo vírus da imunodeficiência humano (HIV) e da infeção congénita por citomegalovírus (CMV) noutros grupos populacionais que não o recém-nascido.(4;5) De realçar que, para além do diagnóstico, são cada vez mais os estudos que demonstram o potencial da sua aplicação noutras áreas, incluindo a monitorização terapêutica,

toxicocinética, farmacocinética.(6)

O DBS oferece algumas vantagens quando comparado com amostras biológicas convencionais tais como sangue total, plasma ou soro. Em primeiro lugar, envolve uma colheita menos invasiva, de mais fácil transporte e armazenamento, facilitando o recrutamento de indivíduos para estudos clínicos e pré-clínicos. Não menos importante, as quantidades de sangue envolvidas são menores (cerca 30-100 μL), o que, tendo em conta o processo de secagem da amostra, reduz significativamente o risco do profissional de saúde contrair uma infecção com HIV ou qualquer outra transmitida por contacto com a amostra de sangue.(7)

Contudo, estes pequenos volumes sanguíneos podem, por outro lado, ser uma limitação ao uso do DBS, pois levam à necessidade de métodos de análise com elevada sensibilidade, exigência que os recentes avanços tecnológicos, assim como o melhoramento de sistemas de deteção imunológicos/genómicos e da espectrometria, têm vindo a contribuir para solucionar.(7)

Inerente às características que possibilitam um armazenamento fácil e pouco dispendioso armazenamento e às tecnologias atualmente disponíveis, esta colheita de sangue tem o potencial de permitir a criação de biobancos de DBS.(8)

A presente revisão vai incluir uma primeira parte onde será descrito o procedimento de colheita, os aspetos pertinentes para a qualidade da amostra, o seu transporte, armazenamento, extração e a análise em si. Será efetuada também referência à metodologia da análise e aos marcadores que poderão ser pesquisados na amostra. Numa segunda parte são enumeradas e descritas mais detalhadamente as vantagens e desvantagens do uso deste tipo de amostra, em comparação com a “clássica” punção venosa, e das utilidades do ponto de vista clínico e pré-clínico. Para concluir esta revisão, apresenta-se um resumo do estado atual da análise usando o DBS e as suas perspetivas para o futuro.

2. Análise com *dried blood spot*

2.1 - Procedimentos inerentes ao DBS como amostra biológica

Antes de discutir os usos do DBS, das suas vantagens e desvantagens, é necessária uma revisão sobre o todo o processo inerente à colheita, conservação, envio, extração e propriedades do sangue que poderão afetar a qualidade da amostra e consequentemente, da análise.

2.1.1 - Colheita

A colheita é realizada através da punção de uma área previamente desinfetada, habitualmente o dedo ou calcanhar (no caso dos recém-nascidos), com o auxílio de uma lanceta descartável, semelhante à lanceta utilizada para a obtenção de amostra de sangue para a avaliação da glicemia capilar. Estas lancetas estão concebidas para realizar uma punção controlada, estimulando fluxo capilar suficiente para a colheita, provocando o mínimo de dano. A primeira gota deve ser descartada, sendo as seguintes gotas de sangue colhidas de forma a preencher o interior dos círculos previamente impressos no papel de filtro apropriados para DBS, até este estar completamente preenchido e saturado, isto é, até ambos lados do cartão mostrarem um aspeto idêntico. Deverá ser permitida a formação da gota no dedo do indivíduo, sendo só depois posta em contacto com o cartão ou, alternativamente, colocada com o auxílio de uma pipeta.(7)

Apesar do procedimento de colheita não ser complicado, deverá ter-se em atenção para não colocar uma gota de sangue em cima de uma zona do papel já previamente preenchida, nem arrastar a gota pelo cartão, de modo a evitar-se a sobressaturação, formação de coágulos ou desigual preenchimento do círculo. Após a colheita, o papel será posto a secar durante cerca de 2 a 3 horas, à temperatura ambiente (15-22°C) numa superfície não absorvente. É necessário ter atenção ao tempo de secagem, pois humidade residual irá favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias. Durante o tempo de secagem as amostras não deverão ser aquecidas, sobrepostas, ou colocadas em contacto com outras superfícies e deve ser evitada a exposição direta à luz do sol.(6;7)

2.1.2 - Conservação

O cartão estabiliza a maioria dos marcadores biológicos no sangue mas, como a taxa de degradação é variável, é necessário avaliar a estabilidade de cada um deles, pois esse será um fator que condicionará diretamente o seu manuseamento e conservação. Uma vez secos, os cartões podem ser empilhados e são colocados num saco de plástico impermeável, com uma substância higroscópica e um indicador de humidade, de modo a finalizar o processo de secagem. O grau de conservação à temperatura ambiente depende do tipo de molécula biológica, variando entre 1 semana para algumas proteínas, até um ano para os ácidos nucleicos.(7) No entanto, se as amostras se destinam para o estudo de biomarcadores considerados instáveis, estas devem ser mantidas congeladas durante o seu armazenamento. Um congelador padrão pode armazenar entre 8000 e 10000 amostras de DBS.(8)

Quando se destinam a quantificações serológicas, os DBS terão de ser conservados a -20°C, mantendo-se viáveis por vários anos, se conservados entre -20 e -80°C.(7) Estima-se que os processos de degradação (oxidação, redução e hidrólise) sejam cerca de 10 vezes mais lentos quando a temperatura é reduzida de 22°C para 0°C.(6)

A par destas duas importantes condições na manutenção de estabilidade de amostra, ainda existem aperfeiçoamentos a fazer ao tratamento químico do suporte em papel para que, de futuro, se possa alargar a gama de biomarcadores, cuja estabilidade se mantém quando conservados em cartão DBS.

2.1.3 - Estabilidade

O DBS acrescenta outra dimensão ao armazenamento de amostras biológicas, dispensando mesmo refrigeração, em alguns casos. Há vantagem na preservação de alguns marcadores instáveis, evitando ou atrasando o processo da sua degradação. Por exemplo, as acilcarnitinas tornam-se instáveis ao fim de 14 dias se o DBS for armazenado à temperatura ambiente, no entanto, quando conservada a temperaturas inferiores a -18°C, as amostras poderão ser estáveis por 330 dias.(6)

2.1.4 - Envio

Os requisitos para o envio são relativamente simples, podendo ser feito dentro de um envelope, evitando preocupações de exposição do profissional de saúde ao sangue ou a qualquer outro material infeccioso.(7)

2.1.5 - Extração

Os protocolos laboratoriais para a análise de amostras de DBS são comparáveis aos de plasma e soro. Após o seu devido processamento, de modo a permitir a análise, os marcadores biológicos terão de ser extraídos do papel de DBS, através de um procedimento padronizado. Tendo em conta que a amostra está num estado seco, adsorvido em meio sólido, esta deverá ser convertida numa solução. Para esse efeito o papel será puncionado, manualmente ou por um sistema automatizado, criando pequenos círculos de papel com o sangue seco, com diâmetro entre 2 e 8mm.(7) Esses círculos serão colocados num tampão ou solvente (metanol, acetonitrilo entre outros) durante um intervalo de tempo variável, dependendo do procedimento que se irá efetuar.(6) Dessa extração resulta um produto que será tratado como uma amostra de sangue total hemolisada, servindo como uma matriz que pode ser sucessivamente diluída e testada usando os métodos pretendidos para sangue total, plasma ou soro.(6) A solução tampão tem um papel fundamental na extração dos marcadores a testar, sendo os mais comuns os tampões salinos ou de fosfato, embora também possam, por vezes, ser utilizados detergentes ou quelantes. Embora fundamental, este passo é responsável por uma das desvantagens desta técnica: ao contrário do que sucede no processamento do sangue total ou do soro, em que todos os componentes celulares serão removidos por centrifugação, no caso do DBS as células encontram-se hemolisadas, e os componentes intracelulares poderão interferir com a análise e afetar as concentrações dos marcadores biológicos extracelulares a quantificar.(9)

2.1.6 - Efeito das propriedades do sangue

Efeito do hematócrito - Hematócrito (HT): volume ocupado pelos elementos figurados do sangue, relativamente ao volume total.

Tendo em conta que o hematócrito é diretamente proporcional à viscosidade do sangue, ele interfere com a fluidez e difusão do sangue aplicado no cartão. Assim, com valores elevados de HT, a difusão do sangue no cartão será deficiente, podendo resultar numa maior quantidade de sangue numa mesma área do cartão, e consequentemente a uma maior concentração de marcadores biológicos na área puncionada, quando comparado com HT mais baixos.(7;9)

Efeito cromatográfico - Também chamado de efeito de distribuição, refere-se à possível interação entre o sangue e/ou o marcadores a analisar com os materiais do cartão de DBS. Este é outro fator que poderá resultar em variações significativas das concentrações de marcadores biológicos quando comparadas com quantificações efetuadas em amostras retiradas na periferia dos círculos, versus quantificações efetuadas em amostras do centro do círculo do DBS, sendo, portanto, uma varável a ter em atenção aquando da seleção da zona em que se realiza a punção.(7;9)

Influência do volume da mancha de sangue - Diferentes volumes colocados no papel podem resultar em medições diferentes dos marcadores, em semelhança ao efeito do hematócrito. Pode haver diferenças dependentes do indivíduo que realiza a colheita da gota de sangue, mas poderá ser ultrapassada com treino e/ou o uso de pipetas calibradas para o efeito.(7;9)

2.2 - Metodologias na análise de DBS

A maioria das metodologias laboratoriais usadas atualmente podem ser aplicadas na quantificação ou identificação de marcadores biológicos de doenças, a partir da amostra do DBS. Destacam-se as técnicas de inibição bacteriana, fluorescência, cromatografia, eletroforese, estudo imunológico, estudo enzimático, espectrometria de massa em *tandem*

(MS/MS) e estudo molecular do ácido desoxirribonucleico (DNA) com PCR, DNA-TREC (*T-Cell Receptor Excision Circles*). Os métodos associados ao estudo do rastreio neonatal por DBS serão apresentados em anexo em forma de tabela (Tabela 1).(3)

Quando acoplado com as diversas técnicas de análise disponíveis, tais como *polymerase chain reaction* (PCR), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), radioimunoensaio (*radioimmunoassay* ou RIA), *High performance liquid chromatography* (HPLC), poderão ser feitas análises a partir de amostras de DBS, com diversas utilidades em vários ramos da química analítica e da medicina, para o diagnóstico e identificação de grupos de risco em várias patologias.(7)

Para a escolha do método a utilizar devem ser considerados vários fatores, tais como os marcadores que se pretendem determinar no estudo (marcador bioquímico, atividade enzimática, estudo do DNA), sensibilidade e especificidade, custos e a possibilidade de quantificar mais do que um marcador simultaneamente.(10)

As limitações de cada método dependem, além do método em si, dos limiares aplicados, da fisiopatologia de cada doença, da idade, do estado nutricional e de possíveis tratamentos em curso. Por exemplo, a resposta ao rastreio de Fenilcetonúria por ensaio de inibição bacteriana fica comprometido quando o recém-nascido é alvo de antibioterapia prévia à colheita.(10)

Técnicas como espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) que permitem a medição de vários biomarcadores em simultâneo, têm tido uma utilização crescente. (11)

Além da possibilidade de diagnosticar várias doenças com uma única análise, a MS/MS vai também permitir a determinação de vários marcadores de uma mesma doença, a partir de uma única amostra, permitindo o cálculo de rácios importantes no diagnóstico. Por exemplo, uma elevação da fenilalanina e tirosina pode ser encontrada na fenilcetonúria, mas também num quadro de insuficiência hepática. Na primeira a relação fenilalanina/tirosina está elevada e na segunda está dentro dos valores normais.

O armazenamento da amostra de DBS terá importância crescente, à medida que o

número de patologias propostas para rastreio aumente e à medida que análises de segunda fase forem introduzidos de modo a melhorar o desempenho do rastreio. Estas análises de segunda fase são de testes confirmatórios, recorrendo um segundo método de análise executado na amostra original e servem para aumentar a especificidade. Um dos exemplos de análises de segunda fase é o caso do hipotiroidismo congénito, em que a deteção de T4 reduzida é confirmado com a medição de hormona estimulante da tiroide (TSH).(12)

Testes de segunda fase adicionais ajudaram também a melhorar o rastreio, sobretudo nas situações em que um mesmo marcador pode corresponder a várias doenças incluídas atualmente no rastreio neonatal alargado com o uso de MS/MS. Exemplo uma elevação de tirosina pode ser encontrada na tirosinemia tipo I, tipo II, tipo III e na fenilcetonúria, tratando-se de entidades clínicas diferentes. O doseamento da succinilacetona num segundo tempo é necessário para confirmar ou excluir a tirosinemia I.(13)

2.3 - Marcadores biológicos quantificáveis pelo DBS

Além dos marcadores biológicos, utilizados no rastreio neonatal em DBS e referidos na Tabela 1, é possível analisar outros marcadores biológicos, que serão apresentados de seguida, estando listados de forma mais completa em anexo na Tabela 2:

Ácidos nucleicos exógenos: A quantificação de ácidos nucleicos é importante na área da infeciologia. Tem havido um aumento no interesse de rastreios virológicos através de deteção de ácidos nucleicos, ácido ribonucleico (RNA) e DNA, utilizando DBS. A necessidade de apenas um pequeno volume de amostra e a alta sensibilidade associada às atuais tecnologias de biologia molecular (Q-PCR [*quantitative polymerase chain reaction*] e RT-PCR [*reverse trasncription polymerase chain reaction*]), fazem do DBS o candidato ideal em vários estudos de infecciologia.(7) Outro ponto a favor é a sua estabilidade e facilidade de preservação, assegurada a correta secagem e armazenamento num saco plástico com dissecante, podendo ser viável e estável durante longos períodos de tempo. O DBS é utilizado maioritariamente para o rastreio de doenças virais tais como infeção por CMV, herpes simplex virus, vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite C (HCV) e HIV.(7)

Peptídeos: É importante realçar a relativa dificuldade de extração de proteínas e peptídeos das amostras de DBS. Existem dois grupos principais de proteínas quantificáveis a partir do DBS: proteínas e anticorpos. As técnicas mais utilizadas são ensaios imunológicos, com boa especificidade e sensibilidade, que medem peptídeos, usando apenas alguns microlitros de sangue. Um dos exemplos é a medição de hemoglobina glicada, usada para monitorizar os pacientes diabéticos, tratando-se de um ensaio imunoturbidimétrico. Os resultados de medição de hemoglobina glicada correlacionam-se bem com os testes clássicos, e o marcador é estável em DBS por um período de 2 semanas. Uma abordagem de quantificação por cromatografia líquida (LC) ou MS (LC/MS) destinada a medir peptídios e proteínas foi adaptada para DBS, de modo a medir ceruloplasmina para rastreio neonatal de doença de Wilson e quantificação de peptídeo C, que é útil no diagnóstico diferencial de diabetes.(14;15)

Lípidos, açúcares e outras pequenas moléculas: A fenilalanina, aminoácido medido no rastreio neonatal da PKU, é um dos exemplos da quantificação de pequenas moléculas em DBS. Pequenas moléculas orgânicas são significativamente menos sensíveis do que as proteínas ao processo de degradação durante a secagem das amostras de DBS.(16)

O desenvolvimento da LC/MS neste campo permitiu a quantificação de muitas moléculas pequenas, tais como a vitamina D. Os triglicerídeos e o colesterol de baixa densidade (LDL), representam um importante risco cardiovascular, podem também ser quantificados em DBS. Estes marcadores biológicos permanecem estáveis em DBS durante 30 dias à temperatura ambiente e até 90 dias a 4°C.(7)

Xenobióticos: Em 1993 foi demonstrada a possibilidade do uso do DBS para a deteção de narcóticos tais como a cocaína, através da modificação de um *kit* de RIA. Desde então, os testes de quantificação de xenobióticos em DBS têm tido um papel importante, principalmente pelo rastreio por LC/MS de fármacos anti- maláricos e antirretrovirais em populações isoladas. No domínio da toxicologia, que constitui uma importante aplicação do DBS, tem sido desenvolvido um novo método de triagem de fármacos baseado em LC/MS, utilizando extração em linha para a quantificação de opiáceos, nomeadamente cocaína e anfetaminas. O desenvolvimento destas novas técnicas de quantificação, baseadas em LC/MS para

xenobióticos, aumentará consideravelmente o papel de DBS na química clínica e medicina forense.(17;18)

2.4 - Vantagens e Desvantagens do uso de DBS

2.4.1 -Vantagens

A vantagem primária do uso de DBS é a obtenção de informação fisiológica que não poderia ser obtida de outra forma, num cenário não clínico.

A colheita de sangue para estudos em DBS é rápida e relativamente indolor, podendo inclusivamente ser realizada em casa, pelo próprio ou um familiar/cuidador, sem a necessidade de estruturas e profissionais especialmente dedicados, utilizando menos material, comparativamente à punção venosa e reduzindo o assim risco de infeções acidentais. A punção é muito menos invasiva, sendo especialmente adequada para pacientes que necessitam de análises sanguíneas seriadas ou frequentes, doentes com acesso venoso difícil, por exemplo nos idosos, e a indivíduos que se opõe à punção com uma agulha, como é o caso das crianças. Para além do facto da colheita ser menos desagradável para o doente, os volumes envolvidos são significativamente menores, quando comparados com os necessários numa punção venosa clássica, rondando estes os 50 microlitros por círculo preenchido. Este pequeno volume de sangue poderá não só melhorar a aceitação da colheita, mas também permitir um maior número de análises com menos espoliação em crianças jovens, ou em animais pequenos, num contexto de estudos pré-clínicos.(7)

Por outro lado, tendo em conta que as amostras de DBS não necessitam de centrifugação, separação ou refrigeração, como no caso da colheita clássica de sangue, este método dá uma certa flexibilidade nos procedimentos de colheita e transporte. Estas características representam uma valiosa ferramenta para amostragens em comunidades difícil acesso, seja pela distância ou por falta de infraestruturas disponíveis. Pelo reduzido tamanho e forma das fichas de colheita, este método torna-se uma solução valiosa, facilitando o armazenamento em laboratórios e biobancos, sem recorrer a métodos de conservação dispendiosos. Estes aspetos serão favoráveis à execução de diferentes tipos de estudos

epidemiológicos e rastreios num maior leque de populações, sendo particularmente úteis em países em desenvolvimento, onde os desafios logísticos e económicos são o maior entrave para a realização e melhoria do sistema de saúde. Relativamente à estabilidade da amostra, muitos estudos mostram que a maioria dos biomarcadores analisados no sangue total são estáveis em temperatura ambiente por 7 dias, e, nalguns casos, tais como os opiáceos, o DBS aumenta a sua estabilidade durante armazenamento, e os ácidos nucleicos poderão inclusive durar vários anos se conservados a -20°C. Esta vantagem permite a pesquisa de novos biomarcadores, à medida que estes sejam descobertos.(7;9)

De um ponto de vista médico-económico, o DBS apresenta um significado decréscimo de custos devido a menor necessidade de material, pessoal treinado e valor imputado ao transporte, sendo uma importante ferramenta para combater obstáculos logísticos e financeiros.(8)

2.4.2 - Desvantagens

Na colheita de sangue seco em papel, a amostra a ser analisada é sangue total, contrariamente à grande maioria dos protocolos padronizados nos laboratórios, que envolvem o uso de soro ou plasma. Isto significa que será necessária a criação de protocolos específicos para validação do ensaio em DBS no que diz respeito à precisão, fiabilidade e aos limites de deteção. Estes ensaios clínicos padronizados estão automatizados e rentabilizados para o uso de soro ou plasma, oferecendo uma rapidez considerável e custo reduzido. Assim, é necessária uma adaptação destas tecnologias para o sangue total seco em papel de forma a tornar as determinações igualmente rápidas e competitivas em termos económicos.(7)

Outra desvantagem de DBS reside na natureza da amostra em si, uma vez que se trata de sangue hemolisado, contrariamente ao sangue total na amostra tradicional. Tendo em conta que no processamento do sangue total ou do soro todos os componentes celulares serão removidos por centrifugação e que na técnica de DBS essas células se encontram hemolisadas, esses componentes intracelulares poderão interferir com a análise e as concentrações dos produtos a analisar.(7) Este é, por exemplo, um obstáculo intransponível na análise da concentração de ferritina. Será então necessário averiguar a correlação entre os

diferentes marcadores biológicos em DBS e na amostra clássica. No seguimento desta lógica, as células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) são alteradas no processo de secagem, impossibilitando os testes hematológicos. A secagem poderá também resultar na desnaturação de proteínas e alterar a sua atividade enzimática. O pequeno volume das amostras pode ser uma desvantagem principalmente no contexto de ensaios de baixa sensibilidade, que necessitem de vários testes ou de um volume de sangue significativo, principalmente nas fases iniciais dos estudos, antes do desenvolvimento de protocolos e metodologias mais sensíveis.(7;8;9)

2.5 - Aplicações do DBS

2.5.1 – Aplicações na área do diagnóstico – Período neonatal

Rastreio neonatal – “teste do pezinho”

Atualmente, o principal uso de DBS é rastreio neonatal sistemático neonatal (RNS), que tem como objetivo detetar, num estado pré-sintomático, doenças para as quais existe tratamento, resultando assim numa redução da morbilidade e mortalidade. Este programa constitui um dos maiores programas de medicina preventiva no mundo ocidental.(19)

Uma década após Bickel ter afirmado que o tratamento dietético da fenilcetonúria podia evitar o atraso mental, se o mesmo fosse iniciado antes do aparecimento dos primeiros sintomas, Guthrie utilizou uma amostra de sangue seco em papel para a determinação semi-quantitativa de fenilalanina, usando um método de inibição bacteriana, criando deste modo as bases para o atual diagnóstico de diversas anomalias hereditárias (2;16).

O rastreio começou a ser realizado de forma sistemática na Europa, Estados Unidos e Canadá, tendo-se iniciado o rastreio da fenilcetonúria a partir da década de 70, e o do hipotireoidismo congénito alguns anos mais tarde.(12) Como resultado, os doentes com estas patologias, em que seria esperado um atraso cognitivo se tivessem iniciado uma terapêutica após um diagnóstico sintomático, cresciam de forma saudável. O rastreio neonatal para estas 2

patologias é hoje efetuado em praticamente todos os países desenvolvidos. Progressivamente, e com base no sucesso desta experiência, o rastreio foi alargado a outras doenças congénitas ou hereditárias desde que cumprissem os critérios definidos para o rastreio, tendo como princípio o facto de serem patologias tratáveis.

A partir do final da década de 90, a aplicação da espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) ao RNS tornou possível detetar um grande número de doenças hereditárias do metabolismo, sem necessidade de aumentar o volume de sangue colhido ao recém-nascido. (20)

Atualmente em Portugal, e após o início da utilização de MS/MS em 2005, o RNS inclui o rastreio bioquímico de 24 doenças metabólicas, sendo que destas, 10 são aminoacidopatias (das quais faz parte a PKU), 7 são acidúrias orgânicas e 7 são doenças hereditárias da β -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos.(21) Além destas patologias e do hipotireoidismo, é atualmente efetuado em Portugal o rastreio da fibrose quística, que utiliza inicialmente marcadores bioquímicos como a Tripsina Imunorreativa e da Proteína Associada à Pancreatite, e numa segunda fase recorre a metodologias de biologia molecular. O rastreio das hemoglobinopatias (β -talassemia) está também a ser implementado como estudo piloto. (21)

O painel de doenças rastreadas varia de país para país e tem em conta a prevalência das patologias e a relação custo benefício do rastreio. Há países onde já é efetuada de forma sistemática o rastreio para doenças lisossomais de sobrecarga que tem terapêutica específica e para imunodeficiências primárias tratáveis. O conjunto painel também não é estanque, podendo iniciar-se o rastreio de novas patologias, mas também suspender rastreios já existentes, se se considerar que não existem benefícios com o referido rastreio. O rastreio para a galactosemia, défice em biotinidase e hiperplasia congénita das suprarrenais foram iniciados como estudo piloto em Portugal, mas foram suspensos posteriormente.(21)

Outras possibilidades de diagnóstico no período neonatal

Ainda, e utilizando os cartões de colheita no período neonatal, pode-se proceder ao rastreio de patologias de natureza infecciosas, nomeadamente para a infeção por CMV e HIV.(4;5) O rastreio da toxoplasmose congénita através de imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina A (IgA), específico para *toxoplasma gondii* é também possível.(7)

A utilização do DBS na detecção de xenobióticos permite a pesquisa de cocaína ou outras drogas de abuso em recém-nascidos, no caso de exposição materna a substâncias ilícitas, e a determinação de níveis plasmáticos de fármacos como quinina, mefloquina, teofilina, entre outros.(7)

2.5.2 – Aplicações na área do diagnóstico – após o período neonatal

Menos exploradas as possibilidades em termos de diagnóstico fora do rastreio neonatal, as possibilidades de utilização são muitas.

Infecçiology – O DBS é útil na detecção do vírus herpes tipo 6 e ainda para a distinção da forma adquirida da forma herdada, para a monitorização de infecção por vírus da hepatite C, quantificação de DNA do vírus da hepatite B (HBV), anticorpos anti-HAV e anti-HBV para além do diagnóstico de infecção por CMV através do anticorpo específico, detecção e quantificação do HIV, detecção de anticorpos anti-malária, anti-vírus linfotrópico da célula T humana tipo 1 (HTLV-1) e vírus linfotrópico da célula T humana tipo 2 (HTVL-2), anti-*Trichomonas vaginalis*; anti- *Treponema pallidum*, detecção de EBV e vírus da rubéola. É também possível a quantificação de IgE, útil tanto em doenças parasitárias como alérgicas.(4;5;7)

É no ramo da infecçiology que o DBS poderá ter um papel preponderante, considerando a dificuldade de acesso às áreas com grande incidência de, por exemplo, infecção por malária e HIV, e com a facilidade de transporte e armazenamento do DBS, este obstáculo poderá tornar-se menor.(8)

Cardiologia - quantificação de proteína C reativa (pCR), LDL e outros marcadores úteis para avaliação do risco cardiovascular.(7)

Obstetrícia - determinação do risco de aneuploidias fetais recorrendo à medição de gonadotrofina coriônica humana (hCG) e proteína A plasmática associada à gravidez (PAPP-A), medição de alfa fetoproteína, cujo aumento poderá ser indicativo de defeitos de tubo neural e síndrome de Down.(7;8)

Pediatria - deficiência de alfa-1-antitripsina, hemoglobinopatias, beta lipoproteinemia para hiperlipidemia familiar tipo II e ceruloplasmina para doença de Wilson.(7;14)

Endocrinologia - rastreio para deficiência de hormona de crescimento (7)

Urologia - rastreio de cancro da próstata através da medição de antígeno específico da próstata (PSA). (7;8)

Genética - No ramo da genética, DBS poderá ser usado na deteção de mutações, quando acoplada a técnicas como PCR e ensaios baseados no DNA, multiplex de sondas dependente de ligação (MLPA), na distrofia muscular espinal, fibrose quística, síndrome X-frágil e ainda deleções genómicas, como, por exemplo 22q11.2 no síndrome de DiGeorge, além de pesquisa de genes de suscetibilidade ao cancro pediátrico.(8;14) Ainda na mesma linha de raciocínio, outra importante aplicação do DBS será na realização de rastreios familiares retrospectivos, tornando-se muito comuns com o avanço da capacidade de diagnóstico crescente.

O rastreio de grupos de populações de risco com manifestações clínicas que podem estar presentes numa determinada doença (exemplo rastreio da doença de Fabry nos doentes em diálise, rastreio da doença de Pompe nos doentes com miopatia) é outra das aplicações possíveis para várias doenças metabólicas passíveis de terapêutica, mesmo após o período neonatal.

2.5.3 - Aplicações na monitorização da doença:

Esta técnica pode ser também usada no correto acompanhamento e monitorização terapêutica dos doentes, sendo o controlo minimamente invasivo, além de confortável para o doente e para a família, pois não há necessidade de deslocação do doente ao hospital, sendo mínima a interferência nas atividades diárias das respetivas famílias.(17;18)

Monitorização de marcadores bioquímicos da doença: Em várias das doenças

diagnosticadas no rastreio, fenilcetonúria, argininemia, hipermetioninemia, tirosinemias, défice no transportador da creatinina, défices em acetil coenzima-A de cadeia média (MCAD) e longa (LCHAD), é possível fazer a monitorização bioquímica básica dos doentes através dos marcadores doseados no sangue do cartão. A colheita é feita pelos cuidadores no domicílio, de acordo com a periodicidade combinada com o médico, e enviada pelo correio para a Unidade de rastreio neonatal que fornece o resultado rapidamente, permitindo ajustar a terapêutica telefonicamente.(3)

É possível também efetuar o doseamento de hemoglobina A1C para o acompanhamento de diabetes, e o doseamento de TSH e tiroglobulina para monitorização da patologia da tiróide.(8)

Monitorização terapêutica - O uso da associação de DBS e a metodologia de MS/MS tem vindo a aumentar no que respeita a estudos clínicos e monitorização terapêutica, podendo abranger um amplo espectro de fármacos, incluindo antipiréticos, antitússicos, antirretrovirais, antimaláricos, imunossuppressores, antiepiléticos para além da sua utilização para monitorizar o consumo de drogas de abuso. No caso do tacrolimus e ciclosporina, que possuem uma estreita margem terapêutica, esta possibilidade de colheita no domicílio é particularmente importante.(7;18)

Na infeção por VIH, a determinação de CD4+ permite determinar a sua progressão e/ou falência terapêutica, para além da possibilidade da serotipagem do vírus. A análise dos xenobióticos em DBS poderá também ser útil para o *follow-up* terapêutico do HIV.(8)

2.5.4 - Outras aplicações

Existe ainda a vertente, por enquanto pouco estudada, da utilização de DBS para estudos pré clínicos, sobre farmacocinética e toxicocinética em pequenos animais de teste, tais como o ratinho. Tendo em conta o pequeno tamanho do animal em questão, e, consequentemente, o seu pequeno volume sanguíneo, seria impossível ignorar a possibilidade de usar DBS, pela sua vantagem, neste caso ainda mais evidente, de requerer uma diminuta quantidade de sangue.(6)

A criação de um biobanco, ou seja, um banco de espécimes biológicos da população,

tem vindo a ser implementado, nomeadamente na Dinamarca, usando amostras colhidas em DBS. Este método de armazenamento, devido aos seus reduzidos custos de armazenamento, ajuda a ultrapassar um dos maiores entraves para a sua criação, nomeadamente económicos. Esta ideia de um biobanco de base populacional poderá abrir possibilidades de investigação e rastreio que até agora não seriam praticáveis.(23)

2.5.5 - Futuro

Excluindo o rastreio neonatal sistemático e os rastreios de populações em risco clínico ou epidemiológico de doença genética, todas as outras aplicações são ainda efetuadas em menor escala. No entanto, com o desenvolvimento e evolução de métodos de análise mais sensíveis, tais como MS/MS, tornou-se possível a implementação de rastreios mais generalizados, e com o tempo será possível reduzir ainda mais os custos associados, com a mecanização do processo de punção dos cartões. A análise e desenvolvimento de outras matrizes, possivelmente não baseadas em celulose ou uma combinação de ambas, tenderá a transformar o DBS numa amostra cada vez mais aceite e reconhecida pela comunidade científica. Assim sendo, muito provavelmente acompanhado com a divulgação crescente da metodologia de MS/MS, o DBS terá um papel cada vez mais preponderante no rastreio, monitorização e investigação de doenças assim como no desenvolvimento e aprovação de novos fármacos.(9) De realçar, que com esta tecnologia, atualmente é possível a determinação de mais de 120 marcadores bioquímicos que incluem metabolitos intermediários (aminoácidos, acilcarnitinas, variantes da hemoglobina, hormona de crescimento e vitamina D entre outros), fármacos, drogas ilícitas e substâncias de *doping* desportivo.(9)

Por outro lado, avanços recentes nas bio- e nanotecnologias levarão ao desenvolvimento de novos microssistemas para separação e análise de biopartículas, que substituirão os sistemas analíticos clássicos. Destacam-se numerosos aparelhos com *microchips*, ultra-sensíveis e capazes de analisar produtos biológicos complexos como o sangue. Estas novas tecnologias, denominadas *digital microfluidics*, permitem, entre outras aplicações como o estudo enzimático, imunológico e molecular, com uma relação custo/benefício favorável e poderão ser incorporadas no rastreio neonatal de doenças lisossomais, peroxisomais, hematológicas e imunológicas num futuro não muito longínquo, abrindo portas a uma nova era do rastreio populacional.(22)

3 - Discussão

Constrangimentos logísticos envolvidos na colheita e análise de amostras biológicas foram desde sempre um impedimento significativo para estudos a nível da comunidade. Com a introdução de novos biomarcadores, possíveis de determinar graças ao desenvolvimento tecnológico e metodológico, surgiu a possibilidade de ultrapassar muitos destes problemas. O DBS, sendo um método minimamente invasivo e com poucos custos associados, poderá ter um papel preponderante neste avanço científico.

A redução dos custos associados à logística da colheita, transporte e análise de uma dada amostra, para além de facilitar a adesão, poderá dar acesso a um rastreio mais generalizado, facilitando assim a realização de um rastreio de base populacional, tendo como consequência, por exemplo, a identificação precoce de indivíduos em risco.

No entanto, a implementação desta abordagem de colheita terá de passar primeiro pela constatação da sua fiabilidade e sua comparabilidade com os outros métodos clássicos. A correlação entre amostras de DBS, sangue total e plasma terá de ser estudada e comprovada, gastando recursos económicos e tempo. Este pormenor poderá resultar em desinteresse por parte dos investigadores, que se sentirão mais seguros com a utilização de um método comprovadamente fiável e bem estabelecido.

A criação de uma base de dados biológicos, tendo como suporte o DBS, apesar de ser um grande avanço em termos de saúde, terá como passo intermédio a criação e/ou adaptação de laboratórios, que se encontram afinados para um alto desempenho com os métodos clássicos. Além disso, novos biomarcadores que forem sendo descobertos, terão, quase certamente, uma aplicação primeiramente em soro e plasma, e só depois surgirão as correlações com DBS. Este atraso será um fator adicional negativo à situação previamente referida.

Em conclusão, ferramentas de pesquisa que incidam na saúde a um nível populacional têm tido grande procura, sendo que métodos minimamente invasivos, que facilitam a medição objetiva e direta dos processos fisiológicos expandem as oportunidades para um conhecimento mais rico da biologia humana e da saúde. O DBS está a ser usado num número crescente de estudos, pelas suas vantagens enumeradas anteriormente, e, com o aumento da lista de marcadores biológicos que podem ser quantificados usando o método em questão, mais cedo ou mais tarde, transitará de um potencial método de rastreio para uma das melhores armas na

investigação

biológica.

IV- BIBLIOGRAFIA

- 1 - Bang I. (1913) A method for the micro-determination of blood components. *Biochem Ztschr* , 49: 19-39.
- 2 - Guthrie R, Susi A (1963). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32:318-43.
- 3 - Martins, Esmeralda - Doenças hereditárias do metabolismo: Importância de um diagnóstico precoce para a criança e para a família. ; [s.l.];[s.d.]; Tese de Doutorado.
- 4 - Barin F et al. (2006) Human immunodeficiency virus serotyping on dried serum spots as a screening tool for the surveillance of the aids epidemic. *J Med Virol* ;78(Suppl 1):S13–8.
- 5 - Scanga L et al. (2006) Diagnosis of human congenital cytomegalovirus infection by amplification of viral DNA from dried blood spots on perinatal cards. *J Mol Diagn* ;8:240–5.
- 6 - Li, Wenkui et al.(2010) Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed. Chromatogr.* ; 24: 49–65
- 7 - Lehmann, S. et al (2013) Current and future use of “dried blood spot” analyses in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med* ; 51(10): 1897–1909
- 8 - McDade TW et al. (2002) Whole blood collected on filter paper provides a minimally invasive method for assessing human transferrin receptor level. *J Nutr* ;132:3760–3.
- 9 - Zakaria R. et al (2016) Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *EJIFCC*. 288-317.
- 10 - Greene C. et al. (2014) Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism. *Physician’s guide to the diagnosis, treatment and follow-up of inherited diseases*. Springer 719-736
- 11 - Milington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR (1990) Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis* 13:321-4.
- 12 - Dussault JH, Laberge C (1973). Thyroxine (T4) determination by radioimmunological method in dried blood eluate: new diagnostic method of neonatal hypothyroidism?. *Union Med Can* 102(10):2062-4.
- 13 - Stinton et al (2017) Newborn screening for Tyrosinemia type 1 using succinylacetone – a systematic review of test accuracy. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 12:48

-
- 14 - Wagner et al. (2014) The Use of Mass spectrometry to analyze dried blood spots. em Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/mas.21441.
- 15 - Lehmann S. et al. (2017) Clinical perspectives of dried blood spot protein quantification using mass spectrometry methods. *Crit Rev Clin Lab Sci.*;54(3):173-184. doi: 10.1080/10408363.2017.1297358. Epub 2017 Apr 10.
- 16 - Bickel et al. (1953) Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 2:812-3.
- 17 - Wilhelm AJ et al (2014) Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: progress to date and future directions. *Clin Pharmacokinet*;53(11):961-73. doi: 10.1007/s40262-014-0177-7.
- 18 - Martial LC et al. (2017) Dried Blood Spot sampling in psychiatry: Perspectives for improving therapeutic drug monitoring. *Eur Neuropsychopharmacol*;27(3):205-216. doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.01.009. Epub 2017 Jan 24.
- 19 - American Academy of Pediatrics. Disponível em: <https://www.aap.org/>. Acesso em: 15 de Maio de 2017
- 20 - Wilcken *et al.* (2003) Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med* 348;23: 2304-12.
- 21 - Vilarinho L et al (2010). Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis* DOI 10.1007/s510545-010-9048-z.
- 22 - Millington. DS et al (2010). Digital microfluidics: a future technology in the newborn screening laboratory. *Semin Perinatol* 34(2):163-9.
- 23 - Nørgaard-Pedersen B. et al. (1999) Biological specimen banks in neonatal screening. *Biological specimen banks in neonatal screening. Acta Paediatr Suppl.* 432:106-9.

ANEXOS

Tabela 1 - métodos usados na análise de DBS em contexto de rastreio neonatal. (Greene et al. 2014)

Metodologia	Fundamento	Usos e comentários
Estudo de inibição bacteriana	Medição do marcador pelo efeito deste no crescimento de bactérias selecionadas pela sua dependência do mesmo	Método original para o rastreio de PKU, sendo substituído por ensaio fluorimétrico e, posteriormente, MS/MS
Ensaio fluorimétrico	Quantificação do marcador pela quantidade de fluorescência comparado com o <i>standard</i>	PKU, homocistinúria, galactosemia, leucinose
Ensaio imunológico	Medição da presença de proteína baseada na interação anticorpo proteína, usando radioatividade para radioimunoensaio (RIA)	Hipotireoidismo, fibrose quística e hiperplasia adrenal congénita
Eletroforese	Determina a presença de proteínas com massa e carga específica	Hemoglobinopatias; deteção do estado de portador
Ensaio enzimático	Determinação semiquantitativa ou quantitativa, medindo a capacidade da enzima de transformar substrato específico em produtos	Galactosemia, deficiência em biotinidase e deteção de algumas enzimas lisossomais

MS/MS	Espectrometria de massa em tandem, inferindo níveis de marcadores baseado na quantidade de fragmentos moleculares comparando com <i>standards</i>	Aminoacidopatias, acidemias orgânicas, defeitos da oxidação dos ácidos gordos. Este método melhorou dramaticamente a sensibilidade e especificidade quando comparado com os métodos de fluorescência e inibição bacteriana
Análise de mutações de DNA	Análise para a presença ou ausência de alterações de sequências específicas ou duplicações e deleções específicas	Usado como teste de segunda fase para a fibrose quística, galactosemia e deficiência de acil-CoA desidrogenase
Repetição de DNA	Análise para o comprimento de segmentos de tripletos repetidos	Síndrome X frágil
DNA-TREC	Quantifica fragmentos de DNA gerados pela maturação de células T	Imunodeficiências graves

Tabela 2 - Marcadores químicos quantificáveis e seu uso

Aplicação	Marcadores biológicos
<u>Endocrinologia</u>	17 α -hidroxipregnenolona; 17 α -hidroxiprogesterona; 11-desoxicortisol; 21-desoxicortisol; Androstenediona; Cortisol; Corticosterona; Desoxicorticosterona; Progesterona; Testosterona; Dihidrotestosterona; Glicose; HbA1C; TSH; T4; T3; globulina ligadora de tiroxina; Tiroglobulina; Prolactina; Hormona luteinizante; IGF-1; Somatomedina-C; Estradiol; Hormona folículo-estimulante, Hormona de crescimento
Erros Inatos do Metabolismo	Alloisoleucina; Homocisteína; dihidroxiacetonafosfato; D-eritrose 4-fosfato; D-frutose 6-fosfato; D-glucose 6-fosfato; D-ribulose -fosfato; Succinilacetona, Ácidos biliares, Ceruloplasmina
Hematologia	Hemoglobinas anômalas; Folato; Ferritina; Receptor da transferrina
Estudo de Dislipidemias	Apolipoproteína A-1; Apolipoproteína B; Triglicerídeos; LDL
Monitorização terapêutica e pós transplantação	Ciclosporina; Atazanavir; Nevirapine; Indinavir; Ritonavir; Efavirenz; Everolimus; Interferon Gama; Fenobarbital; Tacrolimus; Vincristina; Citrulina; Linfócitos CD4+; Posaconazol; Metotrexato; Mefloquina; Teofilina
Toxicocinética e estudos clínicos	Acetaminofeno; Ibuprofeno; Amitriptilina; Paroxetina; Fluoxetina; Citalopram; Benzodiazepinas; Topiramato; Venlafaxina; Imipramina; Loratadina; Dexametasona; Bosentano; Claritromicina; Ertapenem; Rifampicina; Ciclosporina A; Propanolol; Atenolol; Bisoprolol; Dasatinib; Sunitinib; Imatinib; Nilotinib; Omeprazol; Ramipril; Tamoxifeno
Doseamento de drogas ilícitas	Anfetaminas; Cocaína; Δ^9 -Tetrahydrocannabinol; outras substâncias psicoativas

<u>Infecçiology</u>	Anticorpos anti-HAV; Antígeno do HAV; DNA HBV; Anticorpos anti-HBV; Anticorpos anti-HCV; Anticorpos anti-HIV; DNA do HIV; RNA do HIV; Anti-EBV; IgE; Anti-CMV; Anticorpos anti-malária; Anticorpos anti-HTLV-1 e -2; Anticorpos anti- <i>trichomonas vaginalis</i> ; Anticorpos anti-rubéola;
<u>Outros Marcadores</u>	Interleucina -1b; interleucina -6; Factor de necrose tumoral - α ; pCR; LDL; HCG; PAPP-A; α -1 antitripsina